

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RAPPORTS
ENTRE LES MACROALGUES
ET *GAMBIERDISCUS TOXICUS* (DINOPHYCEAE),
AGENT CAUSAL DE LA CIGUATERA

Katia SAINT-MARTIN*, Monique DURAND-CLÉMENT** et Patrick BOURDEAU***

RÉSUMÉ — En confrontant en culture des individus de *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo à diverses macroalgues appartenant aux Chloro-, Phéo- et Rhodophycées, on constate que toutes celles-ci exercent sur la Dinophycée une forte attraction, indépendante de leur position systématique et persistant lorsque leurs cellules sont tuées.

ABSTRACT — Contribution to the study of the relations between macroalgae and *Gambierdiscus toxicus*, Dinophyceae responsible for ciguatera.

Macroalgae belonging to six species of Chloro-, Phaeo- and Rhodophyceae have been placed in culture of the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo. They all exert a strong attraction on them. This attraction has no reference to their systematic position and is persisting if their cells are killed.

MOTS CLÉS : relations inter-organismes, ciguatera, macroalgues, *Gambierdiscus toxicus*, Dinophyceae.

INTRODUCTION

La ciguatera, maladie grave consécutive à l'ingestion de poissons marins toxiques, sévit dans les mers intertropicales (Pacifique central et Mer Caraïbe) où elle est associée aux formations coralliennes. Elle y soulève de sérieux problèmes relatifs à la santé des habitants et à l'exploitation des ressources piscicoles, d'autant plus que poissons sains et poissons toxiques sont indiscernables. Il n'est donc pas surprenant que cette question ait reçu une attention de plus en plus marquée au cours de ces dernières années (Anderson & Lobel, 1987; Bourdeau, 1987).

On a montré (Bagnis *et al.*, 1977; Yasumoto *et al.*, 1977) que le principal agent causal primaire de cette maladie est une algue unicellulaire de la classe des Dinophyceae, *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (GDT). Ingérée par

* Laboratoire de Biologie Végétale Marine, 7 quai St-Bernard, 75230 Paris Cedex 05.

** INSERM Unité 303, B.P. 3, 06230 Villefranche/Mer, France.

*** Laboratoire de Parasitologie, École Nationale Vétérinaire, 94704 Maisons-Alfort, France.

les animaux marins, elle leur communique sa toxicité. Elle semble présente à peu près partout en milieu corallien et elle peut pulluler à certaines occasions qui sont le plus souvent en rapport avec des perturbations du milieu entraînant la mort des coraux; il peut alors s'ensuivre une «flambée cigatérique» (Bagnis, 1971).

Bien que pourvu de deux flagelles, ce microorganisme est peu mobile; on le rencontre rarement en pleine eau mais plutôt auprès du fond ou de supports éventuels et en particulier au contact des algues pluricellulaires (désignées souvent par le terme de macrophytes ou de macroalgues; ce dernier sera utilisé ici). Au sein des populations naturelles, ainsi qu'en culture, très peu d'individus sont mobiles en même temps, la plupart se fixant au fond ou à un support à l'aide d'un filament de mucus.

L'association fréquente, dans la nature, des GDT et des macroalgues est un concept aujourd'hui très généralement admis, si bien que le contrôle des risques de ciguatera en région potentiellement ciguatérigène, qui repose sur l'appréciation de la fréquence des GDT, peut s'effectuer à partir de prélèvements de macroalgues dans lesquels on les recherche ensuite. Toutefois, la nature exacte et les caractéristiques de cette association restent encore à définir (Scheuer & Bagnis, 1985; Anderson & Lobel, 1987). Nous nous sommes attachés à ce problème. Une tentative pour déceler d'éventuels rapports entre la présence des GDT et celle de certaines espèces de macroalgues croissant sur des capteurs installés en milieu naturel, dans le but de mettre en évidence des associations préférentielles, n'a pas apporté de résultats concluants (Saint-Martin, 1987). Nous avons alors abordé la question de manière expérimentale, en confrontant *in vitro* des GDT en culture à des macroalgues elles aussi obtenues de cultures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Matériel vivant

Toutes les espèces sont à l'état de cultures unialgales.

— Les GDT proviennent d'une souche (Durand SB 04) isolée en 1986 sur la côte (baie du Gouverneur) de l'île Saint-Barthélémy (Antilles). Pour cela, diverses macroalgues ont été recueillies, placées dans un sac en plastique et ramenées à la surface. Les échantillons ont été fortement secoués afin de décrocher les organismes benthiques de leur support puis filtrés à travers une maille de 170 μm . Au laboratoire, le surnageant a été éliminé après décantation, le dépôt remis en suspension dans de l'eau de mer stérile et filtré sur maille de 50 μm . Les GDT, présents à raison de 0 à 100 individus par gramme de macroalgues humides, ont été triés un à un sous la loupe binoculaire et rincés par transfert dans des gouttes d'eau de mer stérile. La souche SB 04 est issue d'un échantillon initial de 200 cellules.

Les cultures sont entretenues par repiquages successifs dans le milieu Provasoli «maigre» (Magne, 1986) et maintenues à 26°C sous un flux lumineux issu

de tubes fluorescents de type «blanc industrie» d'une intensité de $48 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ et selon une photopériode de 14 h par jour (Durand-Clément, 1987).

L'appréciation de la densité en individus d'une culture est faite de la façon suivante. On part de la culture préalablement homogénéisée par agitation; on en prélève une partie aliquote (0,5 ml) qu'on transfère dans un récipient de verre à fond plat et qu'on additionne de quelques gouttes de formol. Les GDT tombent au fond et, en s'aidant d'un papier quadrillé sur lequel est posé le récipient, il est aisé de les dénombrer sous la loupe binoculaire étant donné leur grande taille ($70 \mu\text{m}$ de diamètre en moyenne). Au cours de ce travail, chaque opération de dénombrement a été effectuée trois fois et la moyenne des résultats a été retenue comme résultat définitif.

A partir de cultures à forte densité en individus on a pu, par dilution, préparer les cultures de la densité nécessaire aux expériences. Ces dernières ont toujours été exécutées avec des cultures en phase exponentielle.

— Les macroalgues proviennent de capteurs installés en mer, à l'île Saint-Barthélémy également (Bourdeau, 1987); des fragments de ces capteurs, acheminés jusqu'au laboratoire (Paris) dans des conditions compatibles avec la vie des algues, ont constitué le point de départ de cultures unialgales d'un certain nombre d'espèces appartenant aux Chlorophycées, Phéophycées et Rhodophycées.

Seules ont été utilisées ici celles qui ont été reconnues favorables pour des raisons techniques touchant à l'évaluation de la surface des échantillons. Elles appartiennent aux espèces suivantes :

Chlorophycées : *Enteromorpha chaetomorphoides* Boergesen, *Cladophora* sp.

Phéophycées : *Dictyota divaricata* Lamouroux, *Dictyota* sp.

Rhodophycées : *Griffithsia schousboei* Montagne, *Ceramium* sp.

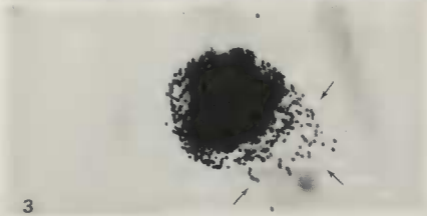
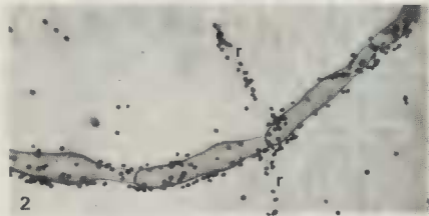
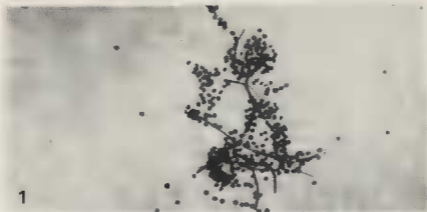
Ces macroalgues sont, elles aussi, entretenues en milieu de Provasoli «maigre», mais à 20°C , sous une lumière de type «blanc industrie» d'intensité $16 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ et selon une photopériode de 12 h par jour.

2. — Déroulement des expériences

Le principe consiste à immerger un échantillon de macroalgue dans une suspension de GDT et à étudier comment se sont répartis les Dinoflagellés au bout d'un temps donné.

Un certain nombre de précautions ont été observées afin d'opérer dans des conditions toujours identiques. Toutes les confrontations ont débuté à la même heure (midi) et ont duré exactement 72 heures. Elles ont toujours été réalisées dans les conditions de culture des GDT; des essais préliminaires ont montré que ces conditions conviennent également aux macroalgues. Les suspensions de GDT utilisées ont toujours été de densité comparable (entre 500 et 600 individus par ml).

En début d'expérience, l'échantillon de macroalgue n'est introduit dans la suspension de GDT qu'après un repos de 30 minutes, ceci afin d'éviter que les



microorganismes, qui ont une forte tendance à sédimenter après avoir été mis en suspension à la suite d'une agitation (Durand, 1984), ne se déposent sur la macroalgue de façon purement passive.

En fin d'expérience, l'échantillon de macroalgue est retiré rapidement avec précaution et réservé. La fixation au formol, nécessaire pour immobiliser les GDT, n'intervient qu'ensuite. Nous avons en effet observé que la liaison macroalgue-GDT est très labile et que l'action du formol suffit à la rompre.

3. — Estimation des résultats

Après expérience, l'échantillon de macroalgue est fixé à l'eau formolée et agité vigoureusement; les GDT se détachent, sont recueillis puis dénombrés. Leur nombre est rapporté à la surface de l'échantillon de macroalgue qui est déterminée après dessin à la chambre claire. Le témoin est constitué par le fond du récipient de culture où l'on détermine le nombre de GDT par unité de surface.

RÉSULTATS

L'expérience a été réalisée à quatre reprises pour *Cladophora* sp. et *Dictyota* sp., à cinq pour les autres espèces. Les résultats sont rassemblés sur le tableau I.

Il apparaît clairement, même en absence de traitement statistique des données, que les GDT se fixent de préférence sur des algues plutôt que sur des supports inorganiques (figure 1 et 2). Cette conclusion a été pleinement confirmée par des expériences complémentaires au cours desquelles des segments de fil de nylon, assimilables par leur forme et leur diamètre aux filaments de certaines des algues utilisées, ainsi que des cubes de gélose (bacto-agar à 1,5 %), ont été proposés comme supports aux GDT mais n'en ont pas attiré plus que le fond du récipient.

Certains résultats sporadiques sont, cependant, aberrants par rapport à l'ensemble (expériences 5 chez *Dictyota divaricata* et *Ceramium* sp.), le sujet n'ayant pas attiré plus de GDT que le témoin.

L'examen des sujets en fin d'expérience a montré que certaines parties des thalles semblent plus particulièrement attractives; ceci a été observé pour les rhizoïdes chez *Cladophora* sp. et *Griffithsia schousboei* (figure 2) et pour les apex chez *Dictyota* sp.

Figures 1 à 3 — Attraction exercée par des macroalgues sur les individus de *Gambierdiscus toxicus* (GDT) en culture; résultats observés 24 heures après introduction des macroalgues: le fond des récipients ne supporte plus que de très rares individus, la presque totalité de ceux-ci étant rassemblée au voisinage immédiat des macroalgues. 1: touffe de *Cladophora* sp. - 2: filament de *Griffithsia schousboei*; malgré leur faible taille, les rhizoïdes (r) ont attiré de nombreux individus. - 3: pelote de thalle pilé de *G. schousboei*, entouré d'une gangue de GDT; la zone marquée de flèches représente la seule partie du fond où existent des GDT, démasqués par un déplacement de la pelote.

Macroalgue		Densité des GDT (en individus/mm ²)	
espèce	surface	sur la macroalgue	sur le témoin
<u>Ectocormpha chaetomorphoides</u>	2,6	46,15	6,4
	2,7	56,66	7,5
	2,5	94,4	8
	2	136	3,84
	3,5	91,4	7,3
<u>Cladophora</u> sp.	4,8	71,2	6,2
	8	49,5	7,5
	2,8	128,5	7
	3,5	93,7	7,32
<u>Dictyota divaricata</u>	84,7	15,5	4,8
	32,2	17,11	8,8
	21,2	74,11	6
	19,4	72,83	4,4
	43	9,76	10
<u>Dictyota</u> sp.	52	14,03	5,9
	24,5	22,7	7,6
	8,16	72,5	8,6
	24	47,58	4,8
<u>Griffithsia schousboei</u>	45,5	35,2	7,2
	17,6	25,9	8,3
	48,2	40,58	6,8
	63	14,57	5,4
	21	35,42	3,64
<u>Ceramium</u> sp.	4,21	115,4	6,24
	7,4	41,3	7,4
	12	57	7
	12	78	4
	14	10,85	7,3

Tableau I — Répartition des GDT à l'issue de confrontations avec des macroalgues.

Il arrive également qu'une partie morte soit autant et même parfois davantage colonisée que les parties vivantes. Une expérience complémentaire, dans laquelle le sujet était constitué par du thalle de *Griffithsia schousboei* écrasé au pilon et aggloméré en une pelote, a confirmé cette constatation (figure 3).

DISCUSSION

D'assez nombreux travaux font plus ou moins directement référence à l'association des GDT aux macroalgues. Celle-ci, qui conditionne vraisemblablement le développement de la Dinophycée dans la nature, conditionne aussi

l'efficacité des prélèvements destinés à contrôler sa présence dans les biotopes et de ce fait à contrôler l'extension des zones ciguatérogènes.

Or il existe une grande confusion concernant les modalités de cette association, ce qui se traduit par une disparité des opinions des différents auteurs et par des contradictions dans leurs résultats. Ainsi par exemple, pour Taylor (1985) les macroalgues les plus hospitalières aux GDT sont les formes ramifiées ou en touffes, tandis que pour Gillespie *et al.* (1985) la structure n'a aucune importance. Et, tandis que Bagnis (1981) trouve sur la Pheophycée *Turbinaria* des GDT en quantité considérable, Carlson *et al.* (1984) n'en observent que fort peu.

Les expériences réalisées ici montrent que les macroalgues exercent une attraction sur les GDT et que ceux-ci se fixent à elles, venant confirmer les observations de Bagnis (1981) qui a conclu à l'épiphytisme. Cette attraction est puissante ainsi qu'en témoignent dans leur ensemble les résultats obtenus ici. Ceux d'entre eux qui marquent une absence d'attraction et paraissent aberrants sont d'une interprétation difficile. Il ne semble pas possible de les mettre à l'actif de fluctuations car il n'existe pas d'intermédiaire entre eux et les autres résultats. On est plutôt tenté de les attribuer à la manifestation par GDT d'une sensibilité particulière à un facteur expérimental qui aurait échappé, malgré toutes les précautions prises. Il faut remarquer à ce propos que le comportement de GDT n'a été que très peu étudié et que l'on ignore encore actuellement presque tout de son éthologie.

L'attraction exercée par les macroalgues semble être indépendante du phylum auquel celles-ci appartiennent : une Chloro-, une Phéo- ou une Rhodophyte ont apparemment autant d'attrait l'une que l'autre pour GDT.

On ne sait encore rien du déterminisme de cette attraction. On est en droit de supposer qu'elle est en relation avec la production et la diffusion, par les macroalgues, d'une ou plusieurs substances recherchées par les GDT. Le travail de Carlson *et al.* (1984), montrant que des extraits de certaines macroalgues peuvent stimuler le développement des cultures de GDT, est un premier soutien à cette hypothèse. D'autre part le fait, rapporté plus haut, que la gélose n'est pas douée de pouvoir attractif, montre que celui qui est constaté chez les macroalgues est vraisemblablement dû à des substances de nature protoplasmique plutôt que pariétale.

REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leurs remerciements à Monsieur le Professeur F. Magne qui a guidé l'un d'eux (K. S.-M.) et est intervenu à plusieurs reprises au cours de ce travail ainsi qu'à Monsieur C. Bidoux et Mademoiselle C. Abélard pour de nombreux avis techniques et pour l'obtention des photographies, enfin à Monsieur F. Partensky pour la communication de documents.

OUVRAGES CITÉS

- ANDERSON D.M. & LOBEL P.S., 1987 — The continuing enigma of ciguatera. *Biol. Bull.* 172 (1) : 89-107.
- BAGNIS R., 1971 — Activité humaine en milieu corallien et ciguatera. *Méd. Trop.* 31 (3) : 285-292.
- BAGNIS R., 1977 — *Modalités évolutives et biogenèse de la ciguatera en Polynésie française*. Thèse Doctorat ès Science, Bordeaux, 128 p.
- BAGNIS R., 1981 — *Étude morphologique, biologique, toxicologique et écologique de l'agent causal princeps de la ciguatera, le péridinien Gambierdiscus toxicus*. Thèse Biologie humaine, Université Bordeaux II.
- BAGNIS R., CHANTEAU S. & YASUMOTO T., 1977 — Mise en évidence d'un agent étiologique vraisemblable de la ciguatera. *Rev. Int. Oceanogr. Méd.* 45-46 : 29-34.
- BOURDEAU P., 1987 — Epidémiologie de la ciguatera aux Antilles (Saint-Barthélémy, Saint-Martin et Anguilla). *Rapport IFREMER*, 161 + 167 (annexes) + 22 (bibliog.) pages.
- CARLSON R.D., MOREY-GAINES G., TINDALL D.R. & DICKEY R.W., 1984 — Ecology of toxic dinoflagellates from the Caribbean Sea : Effects of macroalgal extracts on growth in cultures. In Raguelis E.P., Ed., *Seafood toxins*, Amer. Chem. Soc. Symp. n° 262, pp. 271-287.
- DURAND M., 1984 — *Étude biologique, cytologique et toxicologique de Gambierdiscus toxicus en culture, dinoflagellé responsable de la ciguatera*. Thèse 3e cycle, Université Paris VII.
- DURAND-CLÉMENT M., 1987 — Study of production and toxicity of cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Biol. Bull.* 172 : 108-121.
- GILLESPIE N.C., HOLMES M.J., BURKE J.B. & DOLEY J., 1985 — Distribution and periodicity of *Gambierdiscus toxicus* in Queensland, Australia. In Anderson, White et Baden, Ed., *Toxic Dinoflagellates*, pp. 183-188.
- MAGNE F., 1986 — Anomalies du développement chez *Antithamnionella sarniensis* (Rhodophycées, Cérampiales). I : Formation et début du développement des tétraspores. *Cryptogamie, Algologie* 7 (2) : 135-147.
- SAINT-MARTIN K., 1987 — *Contribution à l'étude des rapports entre les macroalgues et Gambierdiscus toxicus (Dinophyceae), agent causal de la ciguatera*. Rapport DEA Océanologie biologique (Algologie), Univ. Paris 6, 10 p.
- SCHEUER P.J. & BAGNIS R., 1985 — Introduction au Symposium n° 10. *Proc. Int. Reef Congr.* 5, vol. 4 : 401-402.
- TAYLOR F.J.R., 1985 — The distribution of the benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* in the eastern Caribbean. *Proc. Int. Reef Congr.* 5, vol. 4 : 423-428.
- YASUMOTO T., NAKAJIMA I., BAGNIS R. & ADACHI R., 1977 — Finding of a Dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jap. Soc. sci. Fish.* 43 (8) : 1021-1026.